(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2009-512844
(P2009-512844A)
(43)公表日　平成21年3月26日(2009.3.26)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	D	4B065
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18		4H045
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	B	
G01N 33/543	(2006.01)	G01N	33/543	511D	
		G01N	33/543	515D	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 19 頁）

(21)出願番号　特願2008-536049 (P2008-536049)
(86)(22)出願日　平成18年10月17日 (2006.10.17)
(85)翻訳文提出日　平成20年6月23日 (2008.6.23)
(86)国際出願番号　PCT/EP2006/067520
(87)国際公開番号　WO2007/045661
(87)国際公開日　平成19年4月26日 (2007.4.26)
(31)優先権主張番号　0521392.1
(32)優先日　平成17年10月20日 (2005.10.20)
(33)優先権主張国　英国 (GB)
(31)優先権主張番号　0608947.8
(32)優先日　平成18年5月5日 (2006.5.5)
(33)優先権主張国　英国 (GB)

(71)出願人　508122286
ノルディック・バイオサイエンス・ダイアグノスティクス・アクティーゼルスカブ
デンマーク国，２７３０　ヘルレフ，ヘルレフ・ホウズゲーゼ　２０７
(74)代理人　100099623
弁理士　奥山　尚一
(74)代理人　100096769
弁理士　有原　幸一
(74)代理人　100107319
弁理士　松島　鉄男
(74)代理人　100114591
弁理士　河村　英文
(74)代理人　100118407
弁理士　吉田　尚美

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アグリカンおよびそのフラグメントの検出または定量

(57)【要約】
アグリカンおよび／またはアグリカン由来フラグメントについてのイムノアッセイであって、サンプルを、少なくともケラタン硫酸鎖を有する場合にアグリカンのＧ２ドメインに対する特異的結合親和性を有する免疫結合パートナーと接触させる工程と、前記免疫結合パートナーの特異的結合の存在または量を決定する工程とを含み、ＦＦＧＶＧ．．を含むＮ末端アミノ酸配列に結合する第１抗体と、ＡＲＧＳを含むＮ末端アミノ酸配列に結合する第２抗体とを用いるサンドイッチアッセイとして実施できるイムノアッセイ。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
サンプル中のアグリカンおよび／またはアグリカン由来フラグメントを検出のためのまたは定量的に決定するためのイムノアッセイ法であって、前記サンプルを、ケラタン硫酸鎖を有するアグリカンのＧ２ドメインに対する特異的な結合親和性を有する免疫結合パートナーと接触させる工程と、前記免疫結合パートナーの特異的な結合の存在または量を決定する工程とを含む方法。
【請求項２】
前記Ｇ２ドメインがケラタン硫酸鎖を有する場合、および前記Ｇ２ドメインが組換え型で発現される場合の両方において、前記免疫結合パートナーが、アグリカンの前記Ｇ２ドメインに対する特異的結合親和性を有する、請求項２に記載の方法。
【請求項３】
前記免疫結合パートナーを捕捉剤または検出剤として使用するサンドイッチイムノアッセイとして実施される、請求項１または請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記免疫結合パートナーを捕捉剤として使用し、前記免疫結合パートナーを検出剤として使用するサンドイッチイムノアッセイとして実施される、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記捕捉剤が固体表面上に固定化された前記免疫結合パートナーによって提供され、前記検出剤が検出可能な標識を有する前記特異的結合パートナーによって提供される、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
（ａ）前記免疫結合パートナーが固体表面に固定化され、前記サンプルと前記Ｇ２ドメインもしくはそれらの抗体結合部分とを含む標識された競合剤と共にインキュベートされる競合イムノアッセイ、または（ｂ）前記Ｇ２ドメインもしくはそれらの抗体結合部分を含む競合剤が固体表面に固定化され、前記サンプルおよび標識された前記免疫結合パートナーと共にインキュベートされる競合イムノアッセイとして実施される、請求項１または請求項２に記載の方法。
【請求項７】
（ａ）前記免疫結合パートナーを使用し、（ｂ）ＦＦＧＶＧ．．またはＡＲＧＳ．．を含むＮ末端アミノ酸配列に対する特異的結合親和性を有する免疫結合パートナーを使用するサンドイッチイムノアッセイとして実施される方法であって、前記アッセイにおいて（ａ）または（ｂ）の一方が捕捉剤として使用され、そして（ａ）および（ｂ）のうち他方が検出剤として使用される、請求項１または請求項２に記載の方法。
【請求項８】
前記免疫結合パートナー（ｂ）が、ハイブリドーマ細胞系ＡＴＣＣ　ＨＢ１１６７１によって生成される抗体ＡＦ－２８である、請求項６に記載の方法。
【請求項９】
前記サンプルが、滑液、血清、または、軟骨組織片もしくは軟骨細胞の培養物由来の馴化培地のサンプルである、あるいは滑液、血清、または、軟骨組織片もしくは軟骨細胞の培養物由来の馴化培地を含有するサンプルである、請求項１～８のいずれかに記載の方法。
【請求項１０】
サンプル中の軟骨代謝回転のマーカーを検出または定量するためのインビトロにおける方法であって、前記Ｇ２ドメインがケラタン硫酸鎖を有する場合、および前記Ｇ２ドメインが組換え型で発現される場合の両方において、前記サンプルを、アグリカンのＧ２ドメインに対する特異的結合親和性を有する免疫結合パートナーと接触させる工程と、前記免疫結合パートナーの特異的結合の存在または量を決定する工程とを含む方法。
【請求項１１】
前記サンプルが、患者由来のサンプルであり、前記決定された結合レベルと軟骨破壊疾

患状態の不在および／または存在に対応する較正値と比較する工程をさらに含む、請求項９に記載の方法。
【請求項１２】
ケラタン硫酸鎖を有するアグリカンのＧ２ドメインに対する特異的結合親和性を有する免疫結合パートナー。
【請求項１３】
前記Ｇ２ドメインがケラタン硫酸鎖を有する場合、および前記Ｇ２ドメインが組換え型で発現される場合の両方において、アグリカンの前記Ｇ２ドメインに対する特異的結合親和性を有する請求項１１に記載の免疫結合パートナー。
【請求項１４】
モノクローナル抗体または特異的結合特性を有するそのフラグメントの形態である請求項１１または請求項１２に記載の免疫結合パートナー。
【請求項１５】
請求項１３に記載のモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞系。
【請求項１６】
組換えによって発現される、請求項１１または請求項１２に記載の免疫結合パートナー。
【請求項１７】
さらなる抗アグリカン抗体と、
抗アグリカン抗体に結合するペプチド競合剤とのうちの１つ以上と、
任意選択的に、洗浄試薬、バッファー、停止試薬、酵素標識、酵素標識基質、抗マウス抗体、較正標準物質および取扱説明書のうちの１つ以上と、
請求項１１または請求項１２に記載の免疫結合パートナーと
を含むイムノアッセイキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、Ｇ２ドメインを認識する抗体または他の免疫特異的結合パートナーを使用することによって、アグリカンおよびそのフラグメントを検出および／または定量するためのアッセイに関する。
【背景技術】
【０００２】
アグリカンは軟骨細胞によって合成され（Ａｒｃｈｅｒ ａｎｄ Ｆｒａｎｃｉｓ，２００３）、関節の関節軟骨の主要構成成分であり、そこではアグリカンはＩＩ型コラーゲンおよび他のマトリックス分子から構成されている（Ｈａｒｄｉｎｇｈａｍ ａｎｄ Ｆｏｓａｎｇ，１９９５）。
【０００３】
アグリカンは高度にグリコシル化されており、２，０００個を超えるアミノ酸残基を含む。アグリカンは、構造的に３つの別個のドメイン、Ｇ１、Ｇ２およびＧ３から構成されている（図Ａ）。Ｇ２ドメインとＧ３ドメインの間と、より程度は少ないがＧ１ドメインとＧ２ドメインの間に、負に帯電したコンドロイチン硫酸およびケラタン硫酸のオリゴ糖構造を含有する高度にグリコシル化された長い伸長領域が存在する（Ｈａｒｄｉｎｇｈａｍ ＆ Ｆｏｓａｎｇ １９９５）。
【０００４】
変形性関節症は、関節軟骨の不可逆的な破壊を特徴とする。軟骨細胞は、アグリカンを含む新規マトリックス構成成分を合成することによって変性している軟骨を修復しようとする（Ｇａｒｎｅｒｏ ｅｔ ａｌ．，２０００）。
【０００５】
そこで、軟骨における代謝プロセスに関する情報を提供できる生化学的マーカーの必要がある。生化学的マーカーについては記載されてきており、アグリカンおよびそのフラグ

メントの測定については報告されてきた。

【０００６】

ＣＳ８４６試験は、アグリカン分子のＧ２ドメインおよびＧ３ドメイン間のアミノ酸８４６に結合したコンドロイチン硫酸側鎖を認識する抗体を使用する（ＩＢＥＸ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ社）。胎児アグリカンを定量するためにＣＳ８４６試験を適応させるＦＡ－８４６サンドイッチイムノアッセイについても記載されてきた。

【０００７】

例えば「Ａｇｇｒｅｃａｎ　Ｐｒｏｔｅｏｇｌｙｃａｎ」（Ｂｉｏｓｏｕｒｃｅ社、米国）のようなアグリカンについての他の試験も開発されてきた。しかし、抗体の特異性については未だ決定されていない。

【０００８】

他のアグリカンアッセイは、アグリカンのグリコサミノグリカン領域、すなわちＧ２ドメインとＧ３ドメインの間を標的としている（Ｋｏｎｇｔａｗｅｌｅｒｔ　ａｎｄ　Ｇｈｏｓｈ　１９９０；Ｒａｔｃｌｉｆｆｅ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３）。

【０００９】

Ｍｏｌｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．は、アグリカンのコアタンパク質部分のための競合ＥＬＩＳＡは開発したが、抗体の結合領域を特定はしなかった（Ｍｏｌｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９９４）。

【００１０】

Ｇ１ドメインおよびマスキングされていないＧ２ドメインの両方に結合する抗体１－Ｃ－６は開発されている（Ｆｏｓａｎｇ　ａｎｄ　Ｈａｒｄｉｎｇｈａｍ，１９９１）。だが１－Ｃ－６とＧ２ドメインとの反応性のためには、ケラタナーゼを用いてケラタン硫酸側鎖が除去されなければならなかった。したがって、１－Ｃ－６抗体は、体液または生体組織中のアグリカンまたはアグリカンフラグメントについてのアッセイに使用するためには適切でない。

【００１１】

アグリカンについては多数のタンパク質分解性切断部位が記載されており（Ｆｏｓａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２０００；Ｃａｔｅｒｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０００）、金属プロテイナーゼ（ＭＭＰ）の優勢部位は、アミノ酸N^{341}とF^{342}との間の球内ドメイン（ｉｎｔｒａ－ｇｌｏｂｕｌａｒ　ｄｏｍａｉｎ、ＩＧＤ）内に位置している（Ｆｏｓａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．１９９６）。モノクローナル抗体、すなわちＮ末端配列^{342}ＦＦＧＶＧ．．．を含有するポリペプチドのネオエピトープに特異的に結合するＡＦ２８（ＡＴＣＣ　ＨＢ１１６７１）は、以前に開発されている（Ｆｏｓａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．１９９５）。ＡＦ２８抗体は、滑液およびヒト血清中でアグリカンフラグメントを検出するための競合ＥＬＩＳＡにおいて使用されてきた（Ｆｏｓａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，１９９５）。しかし、Ｇ２ドメインに対する抗体と組み合わせたこの抗体の使用についてはこれまで報告されていない。

【００１２】

アグリカンは、多数の特許公報において言及されている。これらのうちのいくつかは、軟骨異化作用を評価する診断目的でのアグリカンまたはこのタンパク質に特徴的な所定のフラグメントの測定について言及している。米国特許第４，７０４，３５６号は、末梢血中のケラタン硫酸（ＫＳ）の異常なレベルが軟骨もしくは軟骨様組織の異常性の指標であることを開示している。末梢血中のＫＳの上昇したレベルは、変形性関節症の指標であると記載されている。興味深いことに、末梢血中のＫＳの不在ならびにＫＳの極めて上昇したレベルは、筋ジストロフィーおよび関連障害の指標であることが見いだされた。末梢血中でＫＳを定量するために使用された技術は、モノクローナル抗体を使用するイムノアッセイであった。

【００１３】

米国特許第５，９３５，７９６号は、軟骨損傷のプロテオグリカンタンパク質に関連する他の診断方法および組成物について記載している。関節軟骨アグリカンを起源とする、

身体組織および体液内の非定型コンドロイチン硫酸（ＣＳ）／デルマタン硫酸のグリコサミノグリカン鎖上の抗原決定基を特異的に認識するモノクローナル抗体を使用する変形性関節症を早期診断、監視および治療するための方法が記載されている。

【００１４】

米国特許第４，７７８，７６８号は、関節内の関節軟骨の進行性破壊を監視するため、およびより詳細には関節軟骨で起きている変化を決定するための方法について記載している。本方法は、（ａ）滑液サンプル中でプロテオグリカンモノマーおよび／またはそれらの抗原性フラグメントを定量する工程と、および（ｂ）このようにして入手したそれらの数値をそのサンプル液に付随する関節軟骨における進行性破壊と関連付ける工程とを含む。プロテオグリカンフラグメントは、プロテオグリカンモノマーに特異的な抗体を使用するイムノアッセイによって測定された。この特許に記載されたアッセイは、上述したポリクローナルＨＡＢｒ　ＥＬＩＳＡと同一であると思われる。

【００１５】

米国特許第５，９４８，６９２号は、ヒアルロン酸（ＨＡ）に対する親和力を有するグリカン類を、そのような親和力を有していないプロテオグリカン類から分離するためのサイズ分離方法を使用するアッセイについて記載している。このアッセイは、アグリカンなどのＨＡ結合プロテオグリカンを測定する。これは、整形外科の分野における関節疾患、ならびに関節リウマチ（ＲＡ）、変形性関節症（ＯＡ）および他の関節疾患の生化学的診断を可能にすると言われている。本方法は、健常関節を罹患関節から識別するため、疾患進行の予後尺度を提供するため、および治療的介入の効果を監視するためにも利用できると言われている。

【００１６】

米国特許第５，４２７，９５４号は、ネオエピトープであるＡＲＧＳＶＩを含有するアグリカンを測定するためのイムノアッセイの使用について記載している。これは、関節疾患の病理的プロセスに関係しているプロテアーゼによって媒介されるアグリカンの特異的タンパク質分解によって生成されるネオエピトープの診断的有用性を記載している多数の開示のうちの１つである。

【００１７】

米国特許第５，３８７，５０４号は、部位N_{341}－F_{342}でのストロメライシンの作用によって遊離されるネオエピトープであるＶＤＩＰＥＮ、およびこのエピトープに対して特異的なモノクローナル抗体を使用するＲＩＡアッセイについて記載している。より一般的には、特異的ストロメライシン切断により生成する、アグリカンのフラグメントに対して特異的な単一特異的抗体の使用について記載されている。ストロメライシンの上昇は、変形性関節症、関節リウマチ、アテローム性動脈硬化症、痛風、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、特発性肺線維症（ＩＰＦ）、所定の癌、関節損傷、および多数の炎症性疾患において発生する。現時点では、これらのアグリカンの「ネオエピトープ」に対して特異的なアッセイの臨床的価値は明確には知られておらず、これらのフラグメントが有意な量で血液循環内に遊離するかどうか、そしてそれらがどのように異化されるのかについては立証されていない。

【００１８】

米国特許第５，９３５，７９６号は、部位N_{341}－F_{342}における軟骨アグリカンの切断によって生成される配列ＦＦＧＶＧを含むペプチドを認識する抗体を使用して、軟骨変形性状態を早期診断、監視および治療するための方法および組成物に関する。このエピトープは、アグリカンへのストロメライシンの作用によって遊離したＶＤＩＰＥＮエピトープの「他方の末端」である。アグリカンのＦＦＧＶＧフラグメントの検出の感受性を向上させるためのサンドイッチアッセイ、より詳細にはＡＦ－２８を５－Ｄ－４などの抗ケラタン硫酸抗体と組み合わせるサンドイッチアッセイを提供することが提案されている。しかし、現在まで、２つの抗体の１つとしてＡＦ－２８を使用する満足のいくサンドイッチアッセイを作製する試みは、実際上は成功していない。

【００１９】

米国特許第５，１８５，２４５号は、滑液中のプロテオグリカンを検出するためのイムノアッセイおよびプロテオグリカンの破壊を特徴とする疾患の治療を監視する方法について記載している。滑液の試験サンプルは、プロテオグリカンを特異的に認識する抗体を使用するイムノアッセイによって定量されるが、抗体は固体支持体上に固定化されている。結合したプロテオグリカンは、次に検出試薬（すなわち、ペルオキシダーゼ）を用いて標識されている第２特異的抗体と接触させられる。どちらの抗体も、プロテオグリカン上のグリコサミノグリカン（ＧＡＧ／ＣＳ）部分に対する親和性を有する。

【００２０】

米国特許第５，３５４，６６２号および米国特許第５，２１７，９０３号は、概して、放射性標識を有する破壊生成物を含む標準物質を用いることによって、動物由来の体液中の結合組織もしくは筋肉組織の破壊生成物の定量に基づく体液中の「組織破壊生成物」の測定について記載している。したがって、標準物質は知られている特異的活性を有するはずなので、標準物質と体液のサンプルとを結合すると、ＲＩＡ／ＩＲＭＡタイプのアッセイにおいて測定された比放射能は、サンプル中の破壊生成物の量の尺度として使用できる。さらに、動物由来の体液中において、動物における選択された結合組織もしくは筋肉組織の状態を評価するための方法、規定の結合組織成分もしくは筋肉組織の破壊を含む疾患プロセスを評価するための方法、およびそのような疾患プロセスを治療するための療法の有効性を評価するための方法が記載されるが、この方法は、組織破壊生成物の量を決定するための方法の工程を含む。

【００２１】

上記に言及した方法は、いずれもケラタナーゼ処理の前に結合させることのできるアグリカンのＧ２ドメイン上に位置するエピトープを認識する抗体を使用することはなく、そのような抗体の使用について考察もしていない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００２２】

本発明は、アグリカンのＧ２ドメインに対する抗体が、アグリカンを検出または定量するためのイムノアッセイにおいて優れた有用性を提供するという発見に基づいている。

【００２３】

天然にはマスキングされていないＧ２－ドメインのエピトープを標的とする抗体は、アグリカンを測定するためのイムノアッセイにおいて有利な効果を提供することが発見された。

【課題を解決するための手段】

【００２４】

したがって、本発明は、第１態様では、サンプル中のアグリカンおよび／またはアグリカン由来フラグメントを検出のためのまたは定量的に決定するためのイムノアッセイ法であって、前記サンプルを、ケラタン硫酸鎖を有するアグリカンのＧ２ドメインに対する特異的な結合親和性を有する免疫結合パートナーと接触させる工程と、前記免疫結合パートナーの特異的な結合の存在または量を決定する工程とを含む方法を提供する。

【００２５】

任意選択的に、前記Ｇ２ドメインがケラタン硫酸鎖を有する場合、および前記Ｇ２ドメインが組換え型で発現するのでケラタン硫酸鎖が欠乏する場合の両方において、前記免疫結合パートナーがアグリカンのＧ２ドメインに対する特異的結合親和性を有する。

【００２６】

記載した方法は、前記免疫結合パートナーを捕捉剤または検出剤として使用するサンドイッチイムノアッセイとして実施することができる。捕捉剤として使用する場合は固体表面に固定化することができ、検出剤として使用する場合は例えば酵素標識、放射標識または蛍光もしくはその他の標識を用いて適切に標識することができる。そのようなサンドイッチアッセイでは、前記結合パートナーは、各々検出剤または捕捉剤としての別の免疫アグリカン結合パートナーまたは免疫アグリカンフラグメント結合パートナーと組み合わせ

て使用できる。詳細には、前記他の結合パートナーは、おそらくはＩＧＤドメインまたはＧ２とＧ３との間または他の場所に位置するＮ末端もしくはＣ末端ネオエピトープである、アグリカンのネオエピトープに対して結合親和性を有する抗体または抗体フラグメントであってよい。

【００２７】

詳細には、本アッセイは、前記免疫結合パートナーを捕捉剤として使用するし、前記免疫結合パートナーを検出剤として使用するサンドイッチイムノアッセイとして実施することができる。適切には、前記捕捉剤は固体表面上に固定化された前記免疫結合パートナーによって提供され、前記検出剤は検出可能な標識を有する前記特異的結合パートナーによって提供される。

【００２８】

または、本発明のアッセイは、（ａ）前記免疫結合パートナーが固体表面に固定化され、前記サンプルおよび前記Ｇ２ドメインもしくはそれらの抗体結合部分を含む標識された競合剤と共にインキュベートされる競合イムノアッセイ、または（ｂ）前記Ｇ２ドメインもしくはそれらの抗体結合部分を含む競合剤が固体表面に固定化され、前記サンプルおよび標識された前記免疫結合パートナーと共にインキュベートされる競合イムノアッセイとして実施できる。

【００２９】

本発明の特に好ましい態様では、本アッセイは、（ａ）前記免疫結合パートナーを使用し、（ｂ）ＦＦＧＶＧ．．を含むＮ末端アミノ酸配列に対する特異的結合親和性を有する免疫結合パートナーを使用するサンドイッチイムノアッセイとして実施されるが、前記アッセイにおいて（ａ）または（ｂ）の一方が捕捉剤として使用され、そして（ａ）および（ｂ）のうち他方が検出剤として使用される。

【００３０】

前記免疫結合パートナー（ｂ）は、当技術分野において以前に記載されたハイブリドーマ細胞系ＡＴＣＣ　ＨＢ１１６７１によって生成される抗体ＡＦ－２８であってよい。

【００３１】

適切には、前記サンプルは、滑液、血清、または軟骨外植片もしくは軟骨細胞の培養物由来の馴化培地のサンプルである、あるいは滑液、血清、または軟骨外植片もしくは軟骨細胞の培養物由来の馴化培地を含有するサンプルである。

【００３２】

本発明は、サンプル中の軟骨代謝回転のマーカーを検出または定量するためのインビトロにおける方法であって、前記Ｇ２ドメインがケラタン硫酸鎖を有する場合、および前記Ｇ２ドメインが組換え型で発現される場合の両方おいて、前記サンプルを、アグリカンのＧ２ドメインに対する特異的結合親和性を有する免疫結合パートナーと接触させる工程と、前記免疫結合パートナーの特異的結合の存在または量を決定する工程とを含む方法を含む。そのような方法は、上述した手順のいずれかによって実施することができる。

【００３３】

前記サンプルは、好ましくは患者由来のサンプルであり、本方法は、決定された結合レベルを軟骨破壊疾患状態の不在および／または存在に対応する較正値と比較する工程をさらに含むことができる。

【００３４】

本発明は、ケラタン硫酸鎖を有するアグリカンのＧ２ドメインに対する特異的結合親和性を有する免疫結合パートナーを含む。好ましくは、そのような免疫結合パートナーは、前記Ｇ２ドメインがケラタン硫酸鎖を有する場合、および前記Ｇ２ドメインが組換え型で発現される場合の両方において、アグリカンのＧ２ドメインに対する特異的結合親和性を有する。そのような免疫結合パートナーは、モノクローナル抗体もしくは特異的結合特性を有するそのフラグメントの形態にあってよい。

【００３５】

本発明は、上述したようなモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞系を含ん

でおり、さらに組換えによって発現される場合はそのような免疫結合パートナーにまで及ぶ。

【００３６】

本発明は、本発明の免疫結合パートナー、および、さらなる抗アグリカン抗体または抗アグリカンフラグメント抗体、抗アグリカン抗体結合ペプチド競合剤または抗アグリカンフラグメント抗体結合ペプチド競合剤のうちの１つ以上と、任意選択的に、洗浄試薬、バッファー、停止試薬、酵素標識、酵素標識基質、抗マウス抗体、較正標準物質および取扱説明書のうちの１つ以上とを含むイムノアッセイキットを含む。

【００３７】

一般に、不均一形式および均一形式、サンドイッチアッセイ、競合アッセイ、酵素結合アッセイ、放射免疫アッセイなどを含む、すべての以前から知られているイムノアッセイの形式は本発明によって使用できる。

【００３８】

本明細書に記載したアッセイは、患者における変形性関節症、関節リウマチおよび軟骨組織が罹患するその他の疾患を含む疾患の診断において有用である。さらに、試験は、疾患進行を評価するために有用であり、療法に対する応答を監視するために有用である。それらはさらに、例えば軟骨または軟骨細胞の培養物などの培養物中のアグリカンまたはアグリカンフラグメントの生成を探求すること、およびそのような培養システムに様々な試薬、薬剤候補および酵素阻害剤が及ぼす作用の研究においても有用である。本発明の免疫結合パートナーは、アグリカンフラグメントを含有する物質の免疫染色において使用できる。

【００３９】

本明細書において使用する用語「免疫結合パートナー」には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体ならびにＦａｂまたはＦ（ａｂ’）$_2$などの抗体の特異的結合フラグメントも含まれる。

【００４０】

アグリカンのＧ２ドメインを認識するモノクローナル抗体は、Ｇ２ドメインのアミノ酸配列に由来する合成ペプチドでマウスを免疫し、選択されたマウス由来の脾臓細胞を骨髄腫細胞と融合させ、アグリカンへの結合のために分泌されたモノクローナル抗体を試験することによって生成できる。重要なことに、そのような抗体は、例えば滑液または血清のサンプルとのコインキュベーションによって、天然アグリカンへの結合能力についても評価されなければならない。

【００４１】

または、精製した無傷アグリカン用いてマウスを免疫することもでき、モノクローナル抗体をＧ２ドメインに対する反応性について選択することができる。Ｇ２ドメインに対する特異性は、（１）精製Ｇ２との反応性、および任意選択的にさらに組換えＧ２もしくはＧ１－Ｇ２との反応性を要求することによって、または（２）精製Ｇ１－Ｇ２（Ｆｏｓａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９）およびＦＦＧＶＧ含有アグリカンフラグメント（ネオエピトープＦＦＧＶＧおよびＧ２を含有するＭＭＰ切断アグリカンフラグメントに対応する）との反応性および任意選択的にさらに組換えＧ２もしくはＧ１－Ｇ２との反応性を要求することによって、または（３）少なくとも精製されたＧ１－Ｇ２との反応性ならびに組換えＧ１および合成ＩＧＤ（Ｇ１およびＧ２を分離する球内ドメイン）との反応性の欠如を要求することによって保証できる。

【００４２】

本発明の１つの態様は、アグリカンのＧ２ドメインを検出および／または定量するための方法に関する。１つのそのような方法は、Ｇ２ドメインへ結合するモノクローナル抗体を使用する競合イムノアッセイである。マイクロタイタープレートの固体表面上にコーティングされる適切に選択された合成ペプチドは、モノクローナル抗体への結合についてサンプルと競合できる。または、精製された天然アグリカンを固体表面上で使用できる。さらにまた別の代替方法は、モノクローナル抗体を固体表面上に固定化し、次にサンプルを

、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼまたはビオチンなどのシグナル分子へ適切に結合した合成ペプチドとコインキュベートすることである。

【００４３】

本発明の１つの態様は、滑液および血清サンプル中でのイムノアッセイによるアグリカンのＧ２ドメインの検出に関する。

【００４４】

本発明のまた別の態様は、軟骨外植片培養、軟骨細胞培養由来の馴化培地中でのイムノアッセイによるＧ２ドメインの検出に関する。

【００４５】

本発明のさらにまた別の態様は、上述した方法を実施するために便宜的に使用できるキットに関する。そのようなキットは、（１）合成ペプチドでコーティングされたマイクロタイタープレート、（２）Ｇ２ドメインを認識するモノクローナル抗体、および（３）標識された抗マウスＩｇＧ免疫グロブリンを含むことができる。または、そのようなキットは、（１）精製アグリカンでコーティングされたマイクロタイタープレート、（２）Ｇ２ドメインを認識するモノクローナル抗体、および（３）標識された抗マウスＩｇＧ免疫グロブリンを含むことができる。または、そのようなキットは、（１）ストレプトアビジンでコーティングされたマイクロタイタープレート、（２）ビオチンに結合した合成ペプチド、（３）Ｇ２ドメインを認識するモノクローナル抗体、および（４）標識された抗マウスＩｇＧ免疫グロブリンを含むことができる。さらにまた別の代替態様は、（１）ストレプトアビジンでコーティングされたマイクロタイタープレート、（２）ビオチンに結合した合成ペプチド、（３）Ｇ２ドメインを認識し、ホースラディッシュペルオキシダーゼにコンジュゲートされたモノクローナル抗体を含むキットである。

【００４６】

本発明のさらになる態様は、サンドイッチ構造において、Ｇ２内のマスキングされていないエピトープに対する抗体を用いることによるアグリカンの検出に関する。

【００４７】

本発明のさらにまた別の態様は、Ｇ２ドメインを認識する抗体とアグリカンのタンパク質分解性切断中に生成したネオエピトープを認識する他の抗体との組み合わせに関する。驚くべきことに、Ｇ２抗体とタンパク質分解性ネオエピトープを認識する抗体との組み合わせは、ネオエピトープを有するアグリカンフラグメントを検出するための試験の感受性における大きな向上を提供した。

【００４８】

本発明の１つの態様は、Ｇ２抗体とマトリックス金属プロテイナーゼ（ＭＭＰ）を用いたアグリカンのタンパク質分解性切断によって生成したネオエピトープを認識する抗体との組み合わせを使用することに関する。好ましい実施形態は、アミノ酸３４１と３４２との間の球内ドメイン（ＩＧＤ）の切断によって生成したＮ末端配列ＦＦＧＶＧ．．．を認識する抗体の使用である。

【００４９】

本発明のまた別の態様は、Ｇ２抗体とアグリカナーゼを用いたアグリカンのタンパク質分解性切断によって生成したネオエピトープを認識する抗体との組み合わせの使用に関する。好ましい実施形態は、アミノ酸３７３と３７４の間の球内ドメイン（ＩＧＤ）の切断によって生成したＮ末端配列ＡＲＧＳ．．．を認識する抗体の使用である。適切な抗体には、ａｂｃａｍ社（ａｂ３７７３）から入手できてＨｕｇｈｅｓ　ｅｔ　ａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｊ（１９９５）３０５，７９９－８０４に記載されている抗体ＢＣ－３、およびＰｒａｔｔａ　ｅｔ　ａｌ．Ｏｓｔｅｏａｒｔｈｒｉｔｉｓ　＆　ｃａｒｔｉｌａｇｅ　Ｍａｒｃｈ　２００６に記載されているモノクローナル抗体ＯＡ－１が含まれる。

【００５０】

本発明のまた別の態様は、上述したアッセイのいずれかにおける抗体の開発および使用に関するが、前記抗体はＧ２および／またはＧ１に位置するマスキングされていないエピトープを認識する。Ｇ１およびＧ２は、相同性を有する伸長したアミノ酸配列を共有する

ので、そのような抗体は本発明によって有用である。

【００５１】

本発明のその他の特徴および有利な効果は、図面および好ましい実施形態の説明、以下の実施例、さらに添付の特許請求の範囲から明らかになる。

【実施例１】

【００５２】

［Ｇ２ドメインを認識するモノクローナル抗体の生成］

５匹の７週齢雌Ｂａｌｂ／ｃマウスに、フロイントの不完全アジュバントと１：１で混合した無傷のウシアグリカン（ＳＩＧＭＡ社、デンマーク）を皮下注射した。免疫付与は２カ月間にわたり２週間毎に繰返し（５回の免疫付与）、次に各免疫付与の間に４週間をあけて継続した。免疫付与開始前および第５回免疫付与の１週間後にマウスから血液を得た。免疫応答は、無傷ウシアグリカンを一晩コーティングしたマイクロタイタープレート（ＮＵＮＣ社、デンマーク）を用いてＥＬＩＳＡによって評価した。マウス抗血清の希釈系列を１時間にわたりインキュベートし、プレートを洗浄し、ホースラディッシュペルオキシダーゼにコンジュゲートされたヒツジ抗マウスＩｇＧ抗体とのインキュベーションによって結合した抗体が明らかになった。

【００５３】

上述のスクリーニングテストにおいて力価が増加しなかった場合は、選択したマウスを４週間休養させ、その後アジュバントを含まない２００μＬの免疫原を用いて腹腔内注射により促進した。３日後に脾臓を切除し、標準的技術を用いて骨髄腫細胞と融合させるために使用した。

【００５４】

増殖しているハイブリドーマ由来の抗体を上述したようにＥＬＩＳＡによって評価した。ハイブリドーマは、限界希釈法によってクローニングのために選択し、培養フラスコ内で増殖させ、そしてモノクローナル抗体はプロテインＧ親和性クロマトグラフィーを用いて精製した。

【００５５】

最後に、モノクローナル抗体をＧ２ドメイン内に位置するマスキングされていないエピトープへの反応性に基づいて選択した（本明細書における用語「マスキングされていない」は、ケラタン硫酸などの「マスク」が除去されているエピトープを意味するのではなく、天然型であるので、例えばケラタン硫酸の存在によって抗体による結合が妨げられないエピトープであることを意味している）。これは、一連のイムノアッセイにおける評価によって遂行した。マイクロタイタープレートには無傷ウシアグリカンをコーティングした。モノクローナル抗体の固体表面への結合は、精製ブタＧ１－Ｇ２（Ｆｏｓａｎｇ ａｎｄ Ｈａｒｄｉｎｇｈａｍ，１９８９）および合成ＩＧＤ（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ社、米国）との競合において決定した。Ｇ１－Ｇ２には結合したがＩＧＤには結合しなかったモノクローナル抗体は、さらにＧ１ドメインを含まないフラグメントに相当する遊離Ｃ末端ＦＦＧＶＧ配列（ＩＧＤドメイン内のアミノ酸３４２－３４６）を有するアグリカンフラグメントに結合する能力について試験した（以下を参照されたい）。

【００５６】

図２は、マイクロタイタープレートの固体表面上にコーティングされたアグリカンへのモノクローナル抗体Ｆ７８の結合を精製ブタＧ１－Ｇ２によって用量依存的に阻害できたことを示している。これとは対照的に、合成ＩＧＤ（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ社、米国）は、抗体を移動させなかった（データは示していない）。

【実施例２】

【００５７】

［Ｇ２フラグメントについてのサンドイッチイムノアッセイ］

上述したようなモノクローナル抗体を使用してサンドイッチアッセイを開発した。ストレプトアビジンプレートは、アグリカンのＧ２ドメインに対する１００μＬの６００ｎｇ／ｍＬのビオチン化Ｆ７８モノクローナル抗体と共に１時間にわたり、３００ＲＰＭ、２

０℃でインキュベートした。
【００５８】
プレートを１時間にわたりインキュベートした後、プレートは洗浄バッファー（０．１５ｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ、０．０５％（ｖ／ｖ）Ｔｗｅｅｎ　２０）を用いて５回洗浄した。引き続いて１００μＬの標準物質（精製ウシアグリカン０．０５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、または事前に希釈したＰＢＳ－ＢＴＢ中の外植片上清）を加え、プレートを１時間にわたり３００ＲＰＭ、２０℃でインキュベートした。インキュベーション期間の後、プレートを上述したように５回洗浄し、５００ｎｇ／ｍＬのホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＰＯＤ）で標識されたＦ７８抗体を加えた。１時間にわたり３００ＲＰＭ、２０℃でインキュベートした後プレートを５回洗浄し、１００μＬのＴＭＢ基質を加え、プレートを暗所で１５分間にわたり３００ＲＰＭ、２０℃でインキュベートし、その後に１５０μＬの０．１８Ｍ　H_2SO_4を加えた。吸光度を４５０ｎｍで直ちに測定した。
【００５９】
図３は、上述したサンドイッチアッセイにおいて得られた標準曲線を示している。
【実施例３】
【００６０】
［^{342}ＦＦＧＶＧ－Ｇ２についてのイムノアッセイ］
アミノ酸配列^{342}ＦＦＧＶＧに対するモノクローナル抗体については、以前に記載されている（米国特許第５，９３５，７９６号）。
【００６１】
ストレプトアビジンプレートは、エピトープ^{342}ＦＦＧＶＧ－Ｇ２に対する１００μＬの１，５００ｎｇ／ｍＬ　ビオチン化ＡＦ－２８モノクローナル抗体と一緒に１時間にわたり、３００ＲＰＭ、２０℃でインキュベートした。抗体希釈液はＰＢＳ－ＢＴＢバッファー中で作製した。プレートを１時間にわたりインキュベートした後、プレートは洗浄バッファー（０．１５ｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ、０．０５％（ｖ／ｖ）Ｔｗｅｅｎ　２０）を用いて５回洗浄した。引き続いて５０μＬの標準物質（ＭＭＰ－１３で消化された精製ブタアグリカン４７～３，０００ｎｇ／ｍＬまたは事前に希釈したＰＢＳ－ＢＴＢ中の外植片上清）を加え、プレートを１時間、３００ＲＰＭ、２０℃でインキュベートした。インキュベーション期間の後、プレートを上述したように５回洗浄し、５００ｎｇ／ｍＬのホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＰＯＤ）で標識されたＦ７８抗体を加えた。１時間にわたり３００ＲＰＭ、２０℃でインキュベートした後、プレートを５回洗浄し、１００μＬのＴＭＢ基質を加え、プレートを暗所で１５分間にわたり３００ＲＰＭ、２０℃でインキュベートし、その後に０．１８ＭのH_2SO_4を１５０μＬ加えた。その後直ちに吸光度を４５０ｎｍで測定した。
【００６２】
図４は、上述したアッセイにおいて得られた標準曲線を示している。重要なことに、^{342}ＦＦＧＶＧ－Ｇ２アッセイにおける検出限界は０．００４ｐｍｏｌ／ｍＬ（１０ｎｇ／ｍＬに対応する）と低く、これはＡＦ２８を用いた競合ＥＬＩＳＡについて以前に報告された検出限界、すなわち７ｐｍｏｌ／ｍＬ（もしくは１７，５００ｎｇ／ｍＬ）（Ｆｏｓａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，１９９５）より相当に低い。
【実施例４】
【００６３】
［ウシ関節軟骨外植片の上清中におけるＧ２および^{342}ＦＦＧＶＧ－Ｇ２フラグメントの検出］
上述したＧ２および^{342}ＦＦＧＶＧ－Ｇ２の試験は、軟骨外植片由来の馴化培地を用いて評価した。ウシ関節軟骨は、未経産牛の後膝関節から得た。軟骨片（１６±４ｍｇ）を９６ウエルプレート内に配置し、３７℃で５％のCO_2を用いて振とうしながら（５０ｒｐｍ）インキュベートした。サイトカインであるオンコスタチンＭおよび腫瘍壊死因子α（ＴＮＦα）またはＭＭＰ阻害剤ＧＭ６００１を含む、または含まない無血清Ｄ－ＭＥＭ培地を使用した。ネガティブコントロールとして、軟骨を冷凍チューブ内に配置し、３回

繰り返される冷凍－解凍サイクルのために液体N_2中で冷凍して３７℃の水浴中で解凍した。外植片培養培地は３日毎に交換し、上清はさらなる分析を行うまで－２０℃で保存した。

【００６４】

図５は、２回のイムノアッセイによって定量した異なる日の上清中におけるアグリカンの代謝回転の測定を示している。ＯＳＭおよびＴＮＦαは、１２日後に^{342}ＦＦＧＶＧ－Ｇ２の増加を刺激することを見て取れる。外植片を、同時にＧＭ６００１の存在下で処理すると、^{342}ＦＦＧＶＧ－Ｇ２の遊離は完全に取り消された。同一実験条件下で、Ｇ２の遊離は完全に相違するプロファイルを示す。上清内へのＧ２の遊離には初期上昇が見られ、５日後にはこれは減少して１２日後にはバックグラウンドレベルに到達する。ＧＭ６００１の添加はＧ２の遊離を阻害しなかったが、これはＧ２アッセイが、^{342}ＦＦＧＶＧ－Ｇ２とは相違して、ＭＭＰ活性には依存せずにフラグメントを検出することを証明している。

【実施例５】

【００６５】

［ウシ関節軟骨外植片の上清中のＣＳ８４６の遊離の測定］

上記で評価した上清をＣＳ８４６についても測定した（ＩＢＥＸ　ＣＳ８４６競合ＥＬＩＳＡキット）。図６は、ＯＳＭおよびＴＮＦαが上清中へのＣＳ８４６の遊離を刺激しないことを示している。しかし、ＭＭＰ活性の阻害中には、ＣＳ８４６の遊離の強い初期上昇が観察されている。これらのデータは、ＣＳ８４６の試験において測定された分析物がタンパク質分解活性によって破壊されるが、これはＧＭ６００１によって阻害できることを示している。

【実施例６】

【００６６】

［Ｇ２フラグメントの検出はＲＡ患者においては低下する］

１５例の健常者および１５例のＲＡ患者由来の血清サンプルを図７に示すＧ２アッセイにおいて定量した。データは、遊離したＧ２分子の検出がコントロールと比較してＲＡ患者においては有意に減少することを証明しており、これは関節症患者においてアグリカンの合成が減少することを意味している。

【実施例７】

【００６７】

［^{342}ＦＦＧＶＧ－Ｇ２フラグメントの検出はＲＡ患者においては上昇する］

同一集団の個人を^{342}ＦＦＧＶＧ－Ｇ２アッセイにおいても同様に測定した。図８から明らかなように、Ｇ２アッセイとは対照的に、^{342}ＦＦＧＶＧ－Ｇ２の遊離したフラグメントは、コントロールと比較してＲＡ患者において有意に上昇した。これは、このアッセイがアグリカンの分解を測定するので、予測されたものと一致している。

【００６８】

本明細書では、他に特に明示しない限り、用語「または」は、条件の１つだけが満たされることを要求する作用語「排他的または」とは対照的に、表示された条件の一方もしくは両方が満たされる場合に真の値を答える作用語の意味で使用されている。用語「含む」は、「～からなる」を意味するのではなく、むしろ「～を含む」という意味で使用されている。

【００６９】

［参考文献］

【表１Ａ】

Caterson B., Flannery C. R., Hughes C. E., Little C. B., Mechanisms involved in Cartilage Proteoglycan Catabolism. Matrix Biology 2000; Volume 19: 333-344

Fosang A.J., Hardingham T.E., Isolation of the N-terminal globular protein domains from cartilage proteoglycans, Biochemical Journal 1989; Vol 261: 801-809.

Fosang A. J., Hardingham T. E., 1-C-6 Epitope in Cartilage Proteoglycan G2 Domain is masked by Keratan Sulphate. Biochemical Journal 1991; Volume 273: 369-373

Fosang A. J., Last K., Gardiner P., Jackson D. C., Brown L., Development of a cleavage-site-specific Monoclonal Antibody for detecting metalloproteinase-derived Aggrecan Fragments in Human Synovial Fluid. Biochemical Journal 1995; Volume 310: 337-343

Fosang A. J., Last K., Maciewicz R. A., Aggrecan is degraded by matrix metalloproteinases in human arthritis. Evidence that matrix metalloproteinase and aggrecanase activities can be independent. J Clin Invest. 1996; 98 Nr. 10:2292-9

Fosang A. J., Last K., Stanton H., Weeks D. B., Campbell I. K., Hardingham T. E., Hembry R. M., Generation and novel distribution of matrix metalloproteinase-derived aggrecan fragments in porcine cartilage explants. The Journal of Biological Chemistry 2000; Volume 275 Nr. 42: 33027-33037

Garnero P., Rousseau J. C., Delmas P., Molecular Basis and Clinical use of Biochemical Markers of Bone, Cartilage and

【表１Ｂ】

Synovium in Joint Diseases. Arthritis and Rheumatism 2000; Volume 43 No. 5: 953-968

Hardingham T. E. and Fosang A. J., The Structure of Aggrecan and its Turnover in Cartilage. The Journal of Rheumatology 1995; Volume 22:1 supplement 43: 86-89

Kongtawelert P. and Ghosh P., A new Sandwich-ELISA Method for the Determination of Keratan Sulphate Peptides in Biological Fluids employing a Monoclonal Antibody and labelled avidin biotin Technique. Clinica Chimica Acta 1990; Volume 195: 17-26

Møller H. J., Larsen F. S., Ingemann-Hansen T., Poulsen J. H., ELISA for the Core Protein of the Cartilage large aggregating Proteoglycan, aggrecan: Comparison with the Concentrations of Immunogenic Keratan Sulphate in synovial fluid, Serum and Urine. Clinica Chimica Acta 1994; Volume 225: 43-55

Ratcliffe A., Shurety W., Caterson B., The quantitation of a native chondroitin sulfate epitope in synovial fluid lavages and articular cartilage from canine experimental osteoarthritis and disuse atrophy. Arthritis and Rheumatism 1993; Volume 36 No. 4:543-51

【図面の簡単な説明】

【００７０】

【図１】アグリカンの構造を示した図である。

【図２】精製ブタＧ１－Ｇ２によるアグリカンへの抗Ｇ２抗体Ｆ７８の結合の用量依存性阻害を示した図である。

【図３】実施例２のイムノアッセイにおいて得られた標準曲線を示した図である。

【図４】実施例３のイムノアッセイにおいて得られた標準曲線を示した図である。

【図５】実施例４のサンドイッチアッセイを用いて得られた結果を示した図である。

【図６】比較イムノアッセイを用いて、実施例５において得られた結果を示した図である。

【図７】実施例６に記載のＧ２サンドイッチアッセイを用いて得られた定量結果を示した図である。

【図８】実施例７に記載のＦＦＧＶＧ－Ｇ２サンドイッチアッセイを用いて得られた定量結果を示した図である。

【図１】

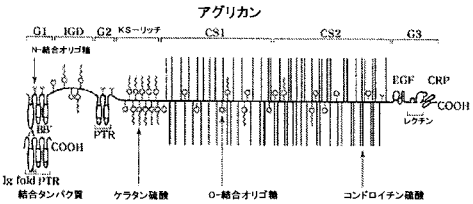

図1

【図２】

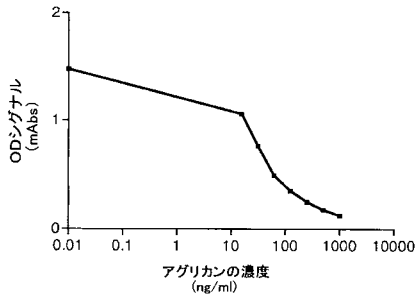

図2

【図３】

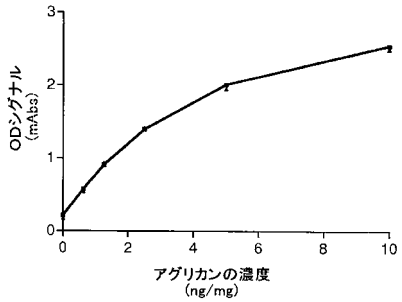

図3

【図４】

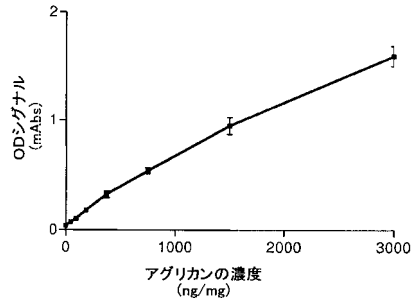

図4

【図５】

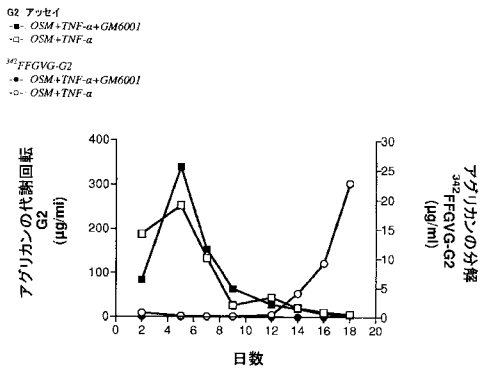

図5

【図６】

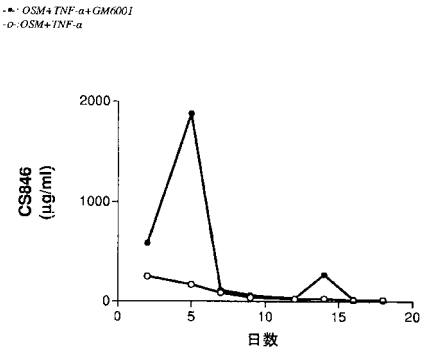

図6

【図７】

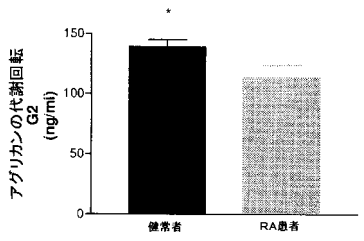

図7

【図８】

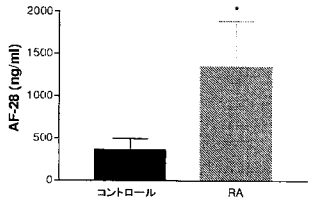

図8

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/067520

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/68 C07K16/44 C12N5/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, PAJ, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97/18194 A (HOECHST AG) 22 May 1997 (1997-05-22) page 49, lines 1-5	1-17
X	VILIM V ET AL: "Proteoglycans isolated from dissociative extracts of differently aged human articular cartilage: characterization of naturally occurring hyaluronan-binding fragments of aggrecan." THE BIOCHEMICAL JOURNAL 15 DEC 1994, vol. 304 (Pt 3), 15 December 1994 (1994-12-15), pages 887-894, XP002415590 London UK ISSN: 0264-6021 page 166, column 2, paragraph 4	1-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
'E' earlier document but published on or after the international filing date
'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
'&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 January 2007	05/02/2007

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Van Bohemen, Charles

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2006/067520

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9718194 A	22-05-1997	AT 213232 T	15-02-2002
		AU 707707 B2	15-07-1999
		AU 7562496 A	05-06-1997
		BR 9611479 A	13-07-1999
		CA 2237590 A1	22-05-1997
		CN 1202156 A	16-12-1998
		CZ 9801453 A3	12-08-1998
		DK 861236 T3	21-05-2002
		EP 0861236 A1	02-09-1998
		ES 2170884 T3	16-08-2002
		HU 9903405 A2	28-04-2000
		JP 2000500145 T	11-01-2000
		PL 326702 A1	26-10-1998
		PT 861236 T	31-07-2002
		RU 2164914 C2	10-04-2001
		TR 9800849 T2	21-07-1998
		US 6207672 B1	27-03-2001

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100125380
弁理士 中村 綾子
(74)代理人 100130960
弁理士 岡本 正之
(74)代理人 100125036
弁理士 深川 英里
(74)代理人 100142996
弁理士 森本 聡二
(72)発明者 シュメール, エレン・ウフク
デンマーク国, １８７９ フレデリクスベア・シー, エイチ・シー・エルステッズヴァイ ６２, １．ｔｈ.
(72)発明者 クヴィスト, ペール
デンマーク国, ２９３０ クランペンボー, タールベク・ストランヴァイ １０３Ｇ

Ｆターム(参考) 4B065 AA90X AB04 BA08 CA25 CA44
4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA50 FA74